



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

PCT/FR97/00496

REC'D 21 APR 1997

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 MARS 1997

Pour le Directeur general de l'Institut
national de la propriete industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone 01 53 04 53 04
Telecopie 01 42 93 59 30



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☒

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52 Télécopie : (1) 42 93 59 30

Reservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES - 9 AVR. 1996
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9604691
DEPARTEMENT DE DÉPÔT LY
DATE DE DÉPÔT 09 AVR. 1996

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant telephone
MD/M</805B2474 72 60 28 90

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance de l'invention (200 caractères maximum)

ISOLEMENT D'UN MATERIEL NUCLEIQUE

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE/NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

SA

Nationalité (s) FRANÇAISE

Adresse (s) complète (s)

CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ ou ☒ non. Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la première fois ☐ requise antérieurement au dépôt (joindre copie de la décision d'admission)

6 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BENEFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE

pays d'origine

numero

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

96 03753

20 MARS 1996

BREVET

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire, n° d'inscription)

Dominique GUERRE
CPI 921104

SIGNATURE DU PROPOSE À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

D. GIRAUD

[Signature]



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tel (1) 42 94 52 52 - Telecopie (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 04691

TITRE DE L'INVENTION :

ISOLEMENT D'UN MATERIEL NUCLEIQUE

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03
FRANCE

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

CROS Philippe
90 rue du Commandant Charcot
69005 LYON

RODRIGUE Marc
14E Chemin de Gargantua
69570 DARDILLY

ELAISSARI Abdelhamid
8 rue Jacques Monod
69007 LYON

SANTORO Lise
1 Place des Quatre Vierges
69110 STE FOY LES LYONS

MABILAT Claude
408 Chemin Pierre Drevet
69140 RILLIEUX LA PAPE

PICHOT Christian
5 Allée Roland Garros
69960 CORBAS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 14 mai 1996

Dominique GUERRE
CPI 921104

La présente invention appartient au domaine de la purification des acides nucléiques, en milieu aqueux.

On connaît selon le document WO-A-95/04140 un procédé pour purifier, en milieu aqueux, des acides nucléiques présents dans un échantillon, selon lequel on met en contact ledit échantillon avec un système particulaire consistant en des billes de silice, en présence d'une substance chaotropique, puis on sépare de la solution aqueuse finale les acides nucléiques fixés sur les billes.

Conformément au document F. MEUNIER et al., Polymers for Advanced Technologies, Vol 6, pp 489-496, (1995), on décrit la préparation d'un polymère dénommé PNIPAM, par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate, en présence d'un amorceur de polymérisation. Le comportement de ce polymère fonctionnalisé en surface peut le rendre particulièrement adapté à une fixation par covalence, de molécules biologiques.

Selon l'invention on apporte un procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléaire, présent dans un échantillon, comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléaire, sur un support particulaire, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, ledit polymère présentant une température

critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C, de préférence entre 30 et 40°C,

selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique, pour adsorber le matériel sur le support particulaire,

selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins un et de préférence au moins deux des paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,
- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
- température inférieure à la LCST du polymère,

selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare, de la phase continue, la phase discontinue et notamment celle ayant adsorbé le matériel nucléique.

Le procédé de l'invention sera préférentiellement mis en oeuvre selon deux variantes relatives à l'étape (a).

Selon une première variante qui sera illustrée dans les Exemples, le support particulaire consiste en ledit polymère particulaire, et dans ce cas le ou les agents de réticulation (2) sont hydrosolubles.

Selon une seconde variante, le support particulaire comprend en outre un noyau organique ou inorganique, tel qu'un noyau de polystyrène, recouvert en totalité ou en partie par ledit polymère particulaire, ledit noyau ne modifiant pas les propriétés d'adsorption du polymère vis-à-vis dudit matériel nucléique. Le noyau ou partie du noyau remplit alors la fonction de l'agent de réticulation (2), un autre agent de réticulation du type agent de réticulation hydrosoluble pouvant être prévu.

Selon une mise en oeuvre particulière et préférentielle de ce procédé, on ajoute dans l'échantillon

avant l'étape (b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape (b), et notamment après l'étape (c) ou l'étape (d), au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel nucléique avant
5 ou après l'étape (b).

Dans une autre mise en oeuvre particulière, le matériel nucléique consiste en une sonde ou une amorce, et selon (b) et (c) on met en contact le réactif d'adsorption avec ledit matériel nucléique, pour obtenir un réactif
10 d'hybridation, puis selon b') après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique,
15 dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

De préférence, pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, pour l'étape (c) d'adsorption, on choisit les deux paramètres suivants :

- 20 - pH au plus égal à 7, et
- température inférieure à la LCST du polymère.

Le polymère particulière est avantageusement obtenu par polymérisation radicalaire, en présence d'un amorceur de polymérisation, cationique ou neutre, et
25 hydrosoluble.

Le premier monomère (1) est de préférence choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, et plus particulièrement parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

35 Le ou les seconds monomères, fonctionnels (3) sont de préférence choisis parmi les dérivés acryliques et

méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinyl-pyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

5 Avantageusement l'agent de réticulation hydrosoluble (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate, et l'amorceur de polymérisation est le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

10 L'étape (d) de séparation est de préférence effectuée selon une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation et la sédimentation.

 Avant l'étape (d) de séparation on peut 15 éventuellement observer que la réaction d'adsorption s'est produite. A titre d'exemple, on peut utiliser les techniques de HPLC ou d'électrophorèse capillaire.

 Pour une étape ultérieure d'analyse, le matériel 20 nucléique adsorbé sur le support particulaire peut être utilisé en l'état, ou après une étape de désorption. Ainsi, après l'étape (c) d'adsorption et après l'étape (d) de séparation :

 selon une étape dite de désorption, on dissocie, par désorption, le matériel nucléique par rapport au 25 support particulaire, en faisant varier le paramètre ou au moins un des paramètres choisis pour l'étape (c) d'adsorption comme suit :

- augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère,
- 30 - augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à $10^{-2}M$,
- augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7.

 Enfin la présente invention a pour objet 1'utilisation d'un polymère particulaire, fonctionnalisé, 35 obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou de dérivé d'acrylamide, (2)

au moins un agent de réticulation et (3) un second monomère, fonctionnel cationique et hydrosoluble, ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) qui est comprise entre 25 et 45°C, pour
5 isoler un matériel nucléique.

Dans une utilisation avantageuse le polymère est obtenu par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate.

10 Avant d'exposer plus en détail l'invention, certains termes employés dans la présente description et dans les revendications sont ci-après définis :

Par isolement d'un matériel nucléique selon l'invention, on comprend la séparation, la détection de ce
15 matériel, l'enrichissement d'une fraction en matériel nucléique, selon une méthode d'isolement spécifique ou aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative.

Un matériel nucléique selon l'invention est un acide nucléique, un fragment d'acide nucléique, un mélange
20 d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, ou une fraction d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques. Par acide nucléique, on entend tout acide nucléique, sous forme libre ou combinée éventuellement à des protéines, quelle que soit son
25 origine cellulaire, bactérienne, virale ou autre. Il s'agit indifféremment d'un acide désoxyribonucléique ou d'un acide ribonucléique, constitué par un enchaînement de nucléotides naturels dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée
30 choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine, et/ou de nucléotides modifiés dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées, telles que l'inosine,
35 la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la

bromo-5-désoxyuridine, et telles que des bases modifiées par un traceur détectable directement ou indirectement par des techniques connues de l'homme du métier, à titre d'exemple les bases modifiées par la biotine ; au niveau
5 du sucre, à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide ; et/ou au niveau du groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl- et aryl-phosphonate et d'alkyl- et aryle-
10 phosphorothioate. L'acide nucléique selon l'invention est totalement ou partiellement monocaténaire et/ou bicaténaire, en particulier il peut consister en un duplex sonde-acide nucléique, sonde-fragment d'acide nucléique, amorce-acide nucléique ou amorce-fragment d'acide
15 nucléique ; le duplex peut être un homoduplex ou un hétéroduplex.

L'invention est bien sûr appliquée à l'isolement de fragments d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus, ou oligonucléotides (ODN), de tailles variables.

20 Le matériel nucléique peut être d'origine naturelle, et/ou obtenu par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique, à titre d'exemple il peut consister en une sonde ou une amorce.

La présente invention est appliquée à l'isolement
25 aspécifique d'une fraction d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, contenue dans un échantillon, mais aussi à l'isolement spécifique d'un acide nucléique ou d'un fragment d'acide nucléique, ou d'un mélange d'acides nucléiques ou de fragments d'acides
30 nucléiques, présents dans un échantillon.

Un échantillon tel qu'on l'entend selon l'invention, comprend tout échantillon susceptible de contenir un matériel nucléique, notamment un échantillon biologique tel que celui obtenu à partir d'un fluide
35 biologique, un échantillon d'origine alimentaire. L'échantillon consiste en tout ou partie d'un échantillon,

en particulier il peut consister en un aliquote, une dilution. L'échantillon peut ou non avoir été soumis à un traitement préalable notamment de purification ou de lyse afin de faciliter la libération des acides nucléiques.

5 La LCST d'un polymère tel que celui qui fait l'objet de la présente invention est notamment définie et mesurée par des techniques décrites dans les documents suivants : Hiroshi Inomata et al., Macromolecules 1994, 27, 6459-6464.

10 Une sonde est un fragment nucléotidique possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique. Une sonde utilisée dans le cadre de la présente invention sera de préférence une sonde de
15 capture, sans pour autant exclure de ce cadre les autres types de sondes.

Par amorce selon l'invention, on entend une sonde possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une
20 polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), la technique dite NASBA ("Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) ou encore la technique dite TMA (Transcription Mediated Amplification), dans un
25 procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue.

Par dérivé acrylamide selon l'invention, on entend un monomère polymérisable répondant à la formule $R^0-CH=C(R^1)-CONR^2R^3$, dans laquelle R^0 , R^1 , R^2 et R^3
30 représentent un groupe indépendamment choisi parmi l'hydrogène, les groupes hydrocarbonés inférieurs, linéaires ou ramifiés, aliphatiques ou cycliques, les groupes hétérocycliques azotés tels que l'imidazole.

L'adsorption de matériel nucléique telle
35 qu'entendue selon la présente invention est définie comme suit : un matériel nucléique est adsorbé sur un support

particulaire si après un temps de contact entre ledit matériel et ledit support, au moins un des groupes appartenant aux éléments constitutifs du matériel nucléique est fixé à la surface du support ; l'adsorption
5 résulte d'interactions ioniques et/ou de liaisons hydrogène, et éventuellement d'interactions hydrophobes, à l'exclusion de toute liaison covalente, entre le matériel et le support.

Enfin par polymère fonctionnalisé, on entend un
10 polymère présentant au moins une interface portant des groupes fonctionnels susceptibles de générer avec des groupes des éléments constitutifs du matériel nucléique, l'une quelconque des interactions et/ou liaisons impliquées dans le phénomène d'adsorption. De préférence
15 ces groupes fonctionnels sont choisis parmi NH_3^+ ; NH_4^+ ; NR_3^+ où R représente un groupe hydrocarboné, saturé ou insaturé, aliphatique ou cyclique, NR_3^+ pouvant représenter le groupe pyridinium ; et le groupe isothiouronium.

20 La présente invention est à présent décrite en référence aux Exemples 1 à 4 et aux Figures 1 à 7 présentées ci-après :

Figure 1 représente la variation de l'interface du polymère en fonction du pH et de la température,

25 Figure 2 représente l'effet du pH et de la température sur l'adsorption de l'ARN,

Figure 3 représente l'effet du pH à 40°C sur l'adsorption de la BSA,

30 Figure 4 représente l'effet de la force ionique et de la température sur l'adsorption de l'ARN,

Figure 5 représente l'effet du pH à 20°C sur la désorption de l'ARN,

Figure 6 représente l'effet du pH à 40°C sur la désorption de l'ARN, et

35 Figure 7 représente l'effet de la force ionique à pH 9,2 et à 20°C sur la désorption de l'ARN.

Comme les exemples suivants l'illustreront, les conditions de pH, de force ionique et/ou de température au cours de l'étape (c) d'adsorption sont déterminantes. En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 1, en-
 5 dessous d'une valeur de pH égale à 7 et de température égale à la LCST du polymère, le polymère présente une chevelure hydrophile, chargée, alors qu'au-dessus d'une valeur de pH égale à 7 et de température égale à la LCST le polymère présente une conformation rétractée hydrophobe
 10 et neutre, ce qui entraîne une diminution de l'adsorption des acides nucléiques et à la fois une adsorption croissante des protéines.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN POLYMÈRE À BASE DE 15 NIPAM

Trois techniques de polymérisation ont été utilisées pour la préparation de ce polymère :
 1) polymérisation en batch (ou procédé en réacteur fermé);
 2) polymérisation en semi-continu et 3) polymérisation sur
 20 semence. Dans chacune de ces techniques, les mêmes réactifs suivants ont été utilisés :

- * Premier monomère : N-isopropylacrylamide (NIPAM) commercialisé par Kodak,
- * Réticulant : N,N-méthylène bisacrylamide (MBA)
 25 disponible chez Aldrich,
- * Amorceur : chlorure de 2,2'-azobis amidino propane (V50) commercialisé par Wako,
- * Sel pour ajuster la force ionique : NaCl (Prolabo),
- 30 * Second monomère, fonctionnel : chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM) commercialisé par Kodak.

1) Polymérisation en batch

Le premier monomère (NIPAM), le second monomère,
 35 fonctionnel (AEM) et le réticulant (MBA) sont introduits ensemble en une seule étape avant que la polymérisation ne

soit amorcée par addition de l'amorceur (V50) qui se décompose sous l'effet de la chaleur en produisant des radicaux libres. La durée de polymérisation est de 30 min.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM42 est la suivante :

| | | |
|----|-----------------------------|--------------|
| | volume total ^(a) | 250 ml |
| | NIPAM | 48,51 mmoles |
| | MBA | 3 mmoles |
| | AEM | 0,48 mmoles |
| 10 | V50 | 0,30 mmoles |
| | Température | 70°C |

(a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristiques du polymère obtenu sont reportées dans le tableau I suivant:

Tableau I

| diamètre ^(a) DDL 20°C | diamètre ^(b) taille DDL 40°C | diamètre ^(c) MET | concentration en AEM ^(d) | LCST ^(e) | CCC ^(f) à 20°C |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|--|---------------------|------------------------------|
| 292 nm | 164 nm | 129 nm | 14,1 µmol/g de polymère | 31,5 °C | 1.00 mole/l |

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

(c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission

(d) densité de charge exprimée en µmole (amine primaire)/g de polymère

(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

2) Polymérisation en semi-continu

Une partie de second monomère, fonctionnel est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la polymérisation et la fin de la conversion totale de celle-ci. Cet ajout peut être effectué à une vitesse d'injection constante (polymérisation par ajout continu) ou bien suivant un ajout bien contrôlé à des intervalles réguliers (polymérisation en semi-continu). Le but de cette méthode de polymérisation est d'augmenter l'incorporation de second monomère, fonctionnel (chargé) sans augmenter le pourcentage de polymère hydrosoluble dans le milieu réactionnel qui pourrait perturber le déroulement de la polymérisation.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM45 est la suivante :

| | | |
|----|-----------------------------|------------------|
| | volume total ^(a) | 250 ml |
| | NIPAM | 48,51 mmoles |
| | MBA | 3 mmoles |
| | AEM | 0,48 mmoles |
| 20 | V50 | 0,30 mmoles |
| | Température | 70°C |
| | ajouts | entre 3 et 6 min |

(a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristique du polymère PNIPAM45 obtenu sont reportées dans le tableau II suivant :

Tableau II

| diamètre ^(a) DDL 20°C | diamètre ^(b) taille DDL 40°C | diamètre ^(c) MET | concentration en AEM ^(d) | LCST ^(e) | CCC ^(f) à 20°C |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|--|---------------------|------------------------------|
| 823 nm | 530 nm | 327 nm | 10,0 µmol/g de polymère | 32 °C | 1.00 mole/l |

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

- (b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C
- (c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission
- 5 (d) densité de charge exprimée en μmole (amine primaire)/g de polymère
- (e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température
- 10 (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

3) Polymérisation sur semence

- 15 Cette technique consiste à introduire le second monomère, fonctionnel dans un milieu réactionnel contenant un polymère préalablement préparé et parfaitement caractérisé. Le second monomère, fonctionnel peut être additionné seul ou en mélange avec le ou les monomère(s)
- 20 ou les comonomères, en une étape ou en semi-continu.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM94 est la suivante :

- Un volume de 40 ml de semence à un taux de solide de 4,5 % est utilisé. Les réactifs ont été ajoutés dilués
- 25 dans un volume de 5 ml d'eau. Les pourcentage molaires de NIPAM, de MBA et de V50 ajoutés dans la deuxième étape sont identiques à ceux de la semence (cf 1)). En revanche, la concentration en second monomère, fonctionnel est contrôlée (augmentée ou diminuée suivant la densité de
- 30 charge voulue) ; dans ce cas 10 % (mole) de AEM sont ajoutés par rapport au premier monomère NIPAM.

- Les caractéristiques du polymère PNIPAM94, obtenu après réensemencement à partir de la semence inscrite sous la référence PNIPAM93 synthétisée suivant le mode
- 35 opératoire décrit dans 1), sont reportées dans le tableau III suivant :

Tableau III

| diamètre ^(a) DDL 20°C | diamètre ^(b) taille DDL 40°C | diamètre ^(c) MET | concentration en AEM ^(d) | LCST ^(e) | CCC ^(f) à 20°C |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|--|---------------------|------------------------------|
| 504 nm | 290 nm | 176 nm | 22,4 µmol/g de polymère | 32 °C | 1,10 mole/l |

- 5
- 10 (a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C
- (b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C
- (c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission
- 15 (d) densité de charge exprimée en µmole(amine primaire)/g de polymère
- (e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température
- 20 (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

En fin de polymérisation les particules sont collectées par simple centrifugation et redispersées dans l'eau ou dans un milieu désiré.

Les caractéristiques du polymère obtenu selon l'une quelconque des techniques 1) à 3) sont les suivantes :

- 30 - densité de charge (cationique) entre 5 et 150 µmol/g de polymère
- intervalle de la taille des particules comprise entre 0,05 et 2 µm, diamètre des particules mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C
- intervalle de la concentration critique de coagulation (CCC) entre 0,001 et 1,5 mole/l NaCl à 20°C et entre 0,01 et 0,9 mole/l NaCl à 40°C.
- 35

**EXEMPLE 2: ADSORPTION D'ARN OU DE BSA
(SERUMALBUMINE BOVINE) SUR DES PARTICULES DE POLYMÈRE
PNIPAM TELLES QUE PRÉPARÉES SELON L'EXEMPLE 1**

5 Le protocole suivant constitue le mode opératoire
général des réactions d'adsorption:

Le mélange réactionnel est constitué de 10 μ l
d'ARN (4 mg/ml) ou de 50 μ l de BSA (5 mg/ml), et de 50 μ l
de particules NIPAM (45g/l). Le volume final de un
10 millilitre est obtenu par adjonction de tampon phosphate
(10 mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M) afin d'atteindre le pH
et la force ionique désirée.

L'entité moléculaire (ARN ou BSA) est adsorbée sur
les particules durant 2 heures (à 20 ou 40°C) avec des
15 conditions prédéterminées (pH, force ionique): le mélange
est centrifugé 20 minutes à 14 000 tours par minute. Le
surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore
Millex-GV13 (0,22 μ m) afin d'éliminer les particules de
polymère en suspension. La quantité de l'entité biologique
20 fixée sur le support polymère est déterminée par une
simple différence entre la quantité initialement
introduite et la quantité restante et libre (dosée dans le
surnageant): cette quantité est exprimée en milligramme de
molécules biologiques par milligramme de polymère (Ns).
25 Les concentrations d'ARN ou de BSA sont estimées par
spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à une longueur
d'onde de 260 nm ou 280 nm, respectivement.

Les essais ont été réalisés avec de l'ARN 16S et
23S ribosomal de *E. coli* (Boehringer) et de la BSA (Sigma
30 référence A0281) utilisés sans purification préalable.

Les particules utilisées sont des particules
thermosensibles de PNIPAM94. Ces particules sont très
hydrophiles à température ambiante et hydrophobes à une
température supérieure à la LCST (32°C). Elles ont été
35 synthétisées comme décrit dans l'exemple 1.

Des tampons phosphate acide (KH_2PO_4 10 mM pH 4,6) et basique (K_2HPO_4 10 mM pH 9,2) ont été utilisés pour les réactions d'adsorption et pour contrôler le pH des réactions.

5 NaCl (5M) a été utilisé pour contrôler la force ionique des réactions.

L'eau utilisée dans l'ensemble des réactions a été purifiée sur le système de purification Millipore-Milli Q.

Les incubations ont été réalisées sur un
10 thermomixer (Eppendorf 5436).

Toutes les réactions ont été réalisées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.

15 1) Etude de l'influence du pH et de la température sur l'adsorption

Conformément à la Figure 2, on observe une meilleure adsorption de l'ARN à pH acide qu'à pH basique. A pH acide les particules sont largement chargées positivement et les acides nucléiques chargés négativement
20 se fixent sur les particules via des forces électrostatiques. La fixation est plus importante à 20°C qu'à 40°C. Les résultats à 40°C illustrent une diminution de l'adsorption.

Conformément à la Figure 3, à 40 °C l'adsorption
25 de la BSA sur les particules est possible sans influence du pH. A 20°C on n'observe aucune fixation de BSA en raison du caractère hydrophile des particules à cette température.

30 2) Etude de l'influence de la force ionique et de la température sur l'adsorption

Conformément à la Figure 4, les forces électrostatiques attractives entre les ARN chargés négativement et la surface de polymère chargée
35 positivement diminuent avec l'augmentation de la force

ionique avec comme conséquence une diminution de la fixation de l'ARN.

Dans les mêmes conditions expérimentales, il a été vérifié que l'augmentation de la force ionique ne favorise pas la fixation de la BSA sur les particules.

En conclusion, les acides nucléiques sont préférentiellement adsorbés sur les particules à température inférieure à la LCST (20°C), à faible force ionique et pH acide. Dans ces conditions l'adsorption des protéines (telle la BSA) n'est pas favorisée.

EXEMPLE 3: DÉSORPTION D'ARN ADSORBÉ SUR DES PARTICULES DE POLYMÈRE PNIPAM

Les réactifs utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans l'exemple 2.

Le protocole suivant constitue le mode opératoire général des réactions de désorption:

Après une étape d'adsorption réalisée comme dans l'exemple 2, la réaction de désorption est effectuée après l'étape de centrifugation à 14000 tours par minute. le surnageant est éliminé et remplacé par un millilitre de tampon de désorption (phosphate (10mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M)) afin d'atteindre le pH et la force ionique désirée. La désorption est réalisée pendant 2 heures à 20°C ou 40°C. Le mélange est ensuite centrifugé 20 minutes à 14000 tours par minute. Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore Millex-GV13 (0,22 µm) afin d'éliminer les particules de polymère en suspension. La quantité d'ARN libérée est déterminée par spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à une longueur d'onde de 260 nm. L'acide nucléique récupéré est disponible pour d'autres analyses.

1) Etude de l'influence du pH et de la température sur la désorption de l'ARN

Conformément à la Figure 5, la désorption des acides nucléiques à pH basique est plus importante en raison de la perte de charge sur le polymère; à pH acide la quantité d'acides nucléiques libérés est beaucoup plus faible car les particules sont alors fortement chargées positivement.

Conformément à la Figure 6, comme précédemment la désorption des acides nucléiques est favorisée à pH basique. Elle est également favorisée par l'augmentation de la température car pour une température supérieure à la LCST (32°C) les particules se rétractent.

2) Etude de l'influence de la force ionique sur la désorption de l'ARN

Conformément à la Figure 7, au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique, les interactions électrostatiques attractives entre les ARN et la surface du polymère diminuent.

En conclusion, la désorption des acides nucléiques est préférentiellement réalisée à 40°C, à forte force ionique et pH basique.

Par ailleurs, la propriété de rétraction des particules à 40°C (température supérieure à la LCST) peut être exploitée pour concentrer une solution d'acide nucléique. En effet, après adsorption des acides nucléiques et élévation de la température au-delà de la LCST, les particules sur lesquelles sont adsorbés les acides nucléiques se rétractent, occupant ainsi un volume moindre qu'à l'état relaxé et permettant la reprise des particules, après centrifugation, dans un volume final plus faible.

EXEMPLE 4: ADSORPTION ET DÉSORPTION D'ADN À PARTIR D'UNE SOLUTION MIXTE D'ADN ET DE BSA, EN UTILISANT LES PARTICULES DE NIPAM

La solution d'ADN de *Staphylococcus epidermidis* est extraite et purifiée à partir de colonies isolées de bactéries, selon le protocole décrit par D. TRECO dans Short Protocols in Molecular Biology Second Edition Ed :
 5 Harvard Medical School, 1992, pp 2-4/2-7.

Une solution de BSA (serum bovine albumine) (Intergen 3210-01) 10 % (p/v) en eau milliQ est utilisée.

Protocole PCR: la technique de PCR suivie est celle décrite par Goodman dans PCR Strategies Ed : Innis,
 10 Gelfand et Sninsky Academic Press 1995, pp17-31. Deux amorces d'amplification ont été utilisées; elles présentent les séquences suivantes:

Amorce 1 : 5' ATCTTGACATCCTCTGACC 3'--->SEQ ID N01

Amorce 2 : 5' TCGACGGCTAGCTCCAAAT 3'--->SEQ ID N02

15

Les cycles de température suivants ont été utilisés lors du protocole d'amplification:

| | | | |
|----|---------|-----------|------|
| | 1 fois | 3 minutes | 94°C |
| | | 2 minutes | 65°C |
| 20 | 35 fois | 1 minute | 72°C |
| | | 1 minute | 94°C |
| | | 2 minutes | 65°C |
| | 1 fois | 5 minutes | 72°C |

10 µl de produit d'amplification sont déposés sur
 25 gel d'agarose 0,8% (FMC 50003) préalablement coloré au bromure d'éthidium. Après migration électrophorétique 45 minutes à 180V, les bandes d'acides nucléiques sont visualisées sous rayonnement ultra-violet (D. VOYTAS dans Short Protocols in Molecular Biology Second Edition Ed :
 30 Harvard Medical School, 1992, pp2-13/2-14).

1) Adsorption et désorption d'ADN sur les particules et détection après technique PCR, de l'ADN libéré

35 Une solution d'ADN (10^{10} copies/ml) a été adsorbée sur les particules à 20°C, pH 4,6 pendant deux heures puis

soumise à une étape de désorption de 15 minutes à 41°C, pH 8,3, force ionique 0,05 M comme décrit dans les exemples 2 et 3, respectivement. Après l'étape de désorption et centrifugation, le matériel récupéré dans 50 µl de surnageant a été amplifié par PCR et analysé sur gel d'agarose 0,8 %. Une bande de taille attendue (490 pb) est détectée sur gel. Par ailleurs, la quantité d'ADN détectée après PCR est au moins équivalente à celle détectée après amplification par PCR de 10⁶ copies/ml d'ADN non adsorbé au préalable sur particules.

Les particules de NIPAM94 peuvent donc être également utilisées pour adsorber de l'ADN. Après désorption l'ADN peut être utilisé dans une réaction d'amplification de type PCR.

2) Adsorption d'ADN à partir d'une solution mixte ADN et BSA, et détection après technique PCR, de l'ADN libéré par désorption

Une solution d'ADN (10¹⁰ copies/ml) en présence de 10 % (p/v) de BSA est soumise à une étape d'adsorption et de désorption comme décrit dans l'exemple 4-1. Les mêmes techniques d'amplification et de détection sont utilisées. Un ADN de taille attendue (490 pb) est détecté sur gel. L'intensité de la bande d'ADN visualisée est la même en présence ou en absence de BSA.

Les particules de NIPAM94 permettent d'adsorber et de libérer par désorption de l'ADN provenant d'une solution mixte ADN - 10% BSA. La présence de la BSA dans la solution initiale ne perturbe pas l'adsorption de l'ADN sur les particules.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléique, présent dans un échantillon, 5 comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléique, sur un support particulaire, caractérisé en ce que :

* selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption 10 comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé 15 d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C,

20 * selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique, pour adsorber le matériel sur le support particulaire,

* selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la 25 mise en contact selon (b), on choisit au moins un des paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,
- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
- température inférieure à la LCST du polymère,

30 * selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue de la phase continue.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support particulaire consiste en 35 un polymère particulaire, fonctionnalisé, obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble,

d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation hydrosoluble et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support particulaire comprend en outre un noyau organique ou inorganique, tel qu'un noyau de polystyrène, recouvert en totalité ou en partie par ledit polymère particulaire, ledit noyau ne modifiant pas les propriétés d'adsorption du polymère vis-à-vis dudit matériel nucléaire.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que selon l'étape (c) d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins deux desdits paramètres.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on ajoute dans l'échantillon avant l'étape (b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape (b) et notamment après l'étape (c) ou l'étape (d) au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel nucléaire.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que :

* selon (b) et (c) on met en contact le réactif d'adsorption avec le matériel nucléaire consistant en une sonde ou une amorce, pour obtenir un réactif d'hybridation,

* selon (b') après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique,

dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

7. Procédé selon l'une quelconques des revendications précédentes, caractérisé en ce que pour
5 l'étape (c) d'adsorption, on choisit les deux paramètres suivants :

- pH au plus égal à 7,
- température inférieure à la LCST du polymère,

8. Procédé selon l'une quelconque des
10 revendications précédentes, caractérisé en ce que la LCST du polymère est comprise entre 30 et 40°C.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi parmi les N-
15 alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le
20 N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

11. Procédé selon l'une quelconque des
25 revendications précédentes, caractérisé en ce que le ou les seconds monomères fonctionnels (3) sont choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinylpyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés
30 de chlorure d'isothiouronium.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent de réticulation hydrosoluble (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol
35 diméthacrylate.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'amorceur de polymérisation est choisi parmi les amorceurs neutres et cationiques, hydrosolubles, tel que
5 le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape (d) de séparation, une étape dite de désorption, selon laquelle on dissocie, par désorption,
10 le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en faisant varier au moins un des paramètres choisis pour l'étape (c) d'adsorption, comme suit :

- augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à $10^{-2}M$,
- 15 - augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7,
- augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape
20 (d) de séparation est effectuée par une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation, et la sédimentation.

16. Utilisation d'un polymère particulaire, fonctionnalisé, obtenu par polymérisation de (1) un
25 premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou de dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) qui est comprise
30 entre 25 et 45°C, pour isoler un matériel nucléique.

17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que le polymère PNIPAM est obtenu par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-
35 méthacrylate.

1/4

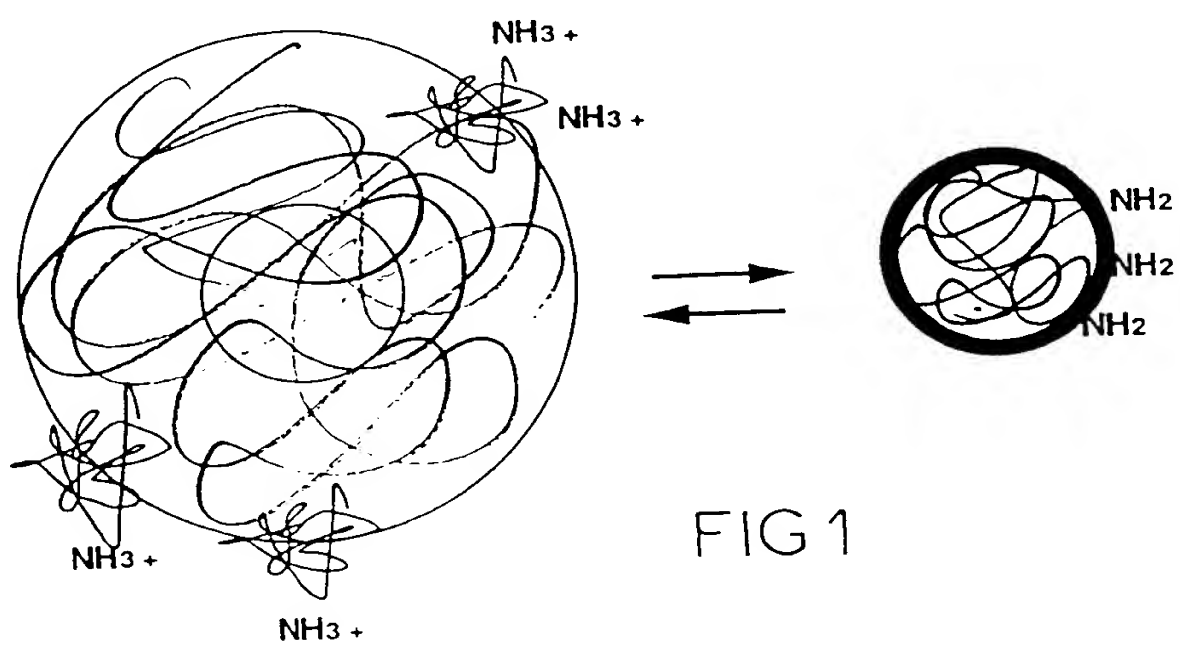


FIG 1

FIG 2

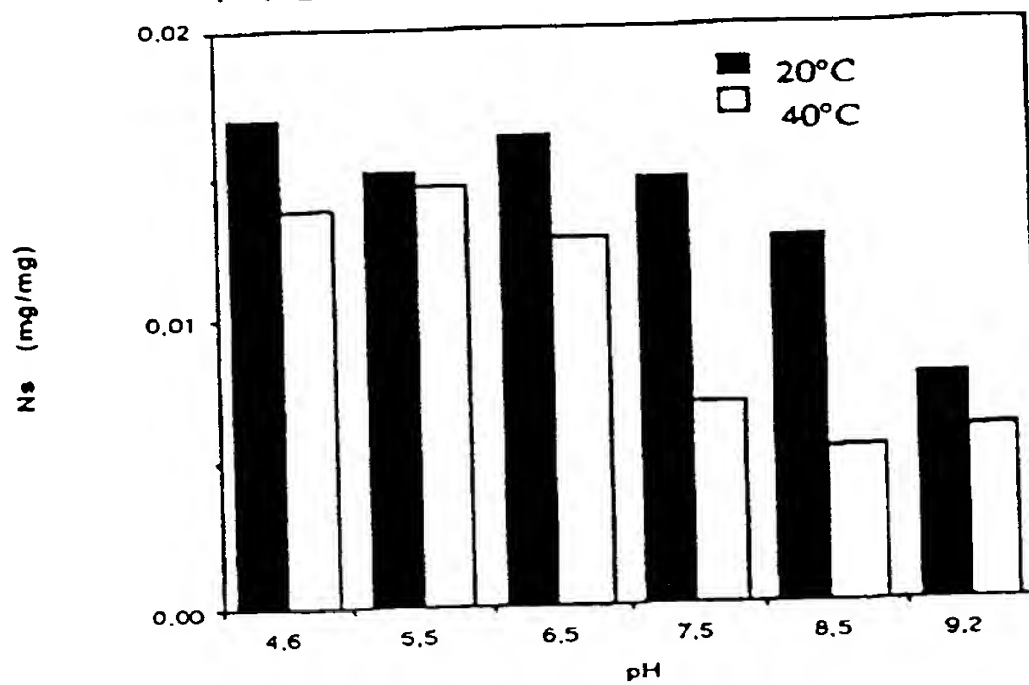


FIG 3

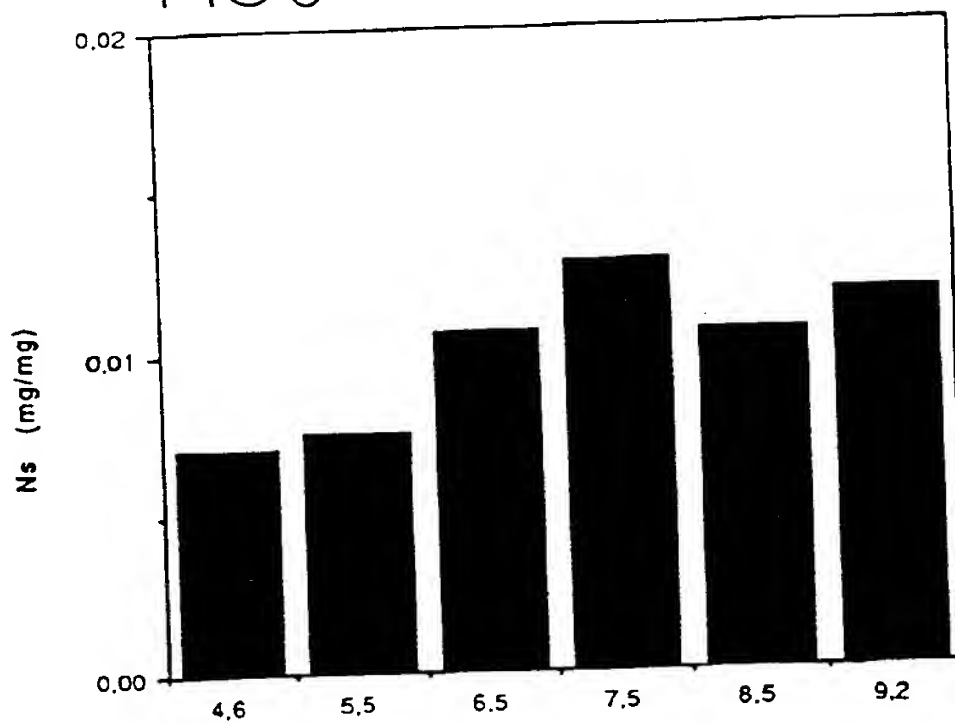


FIG 4

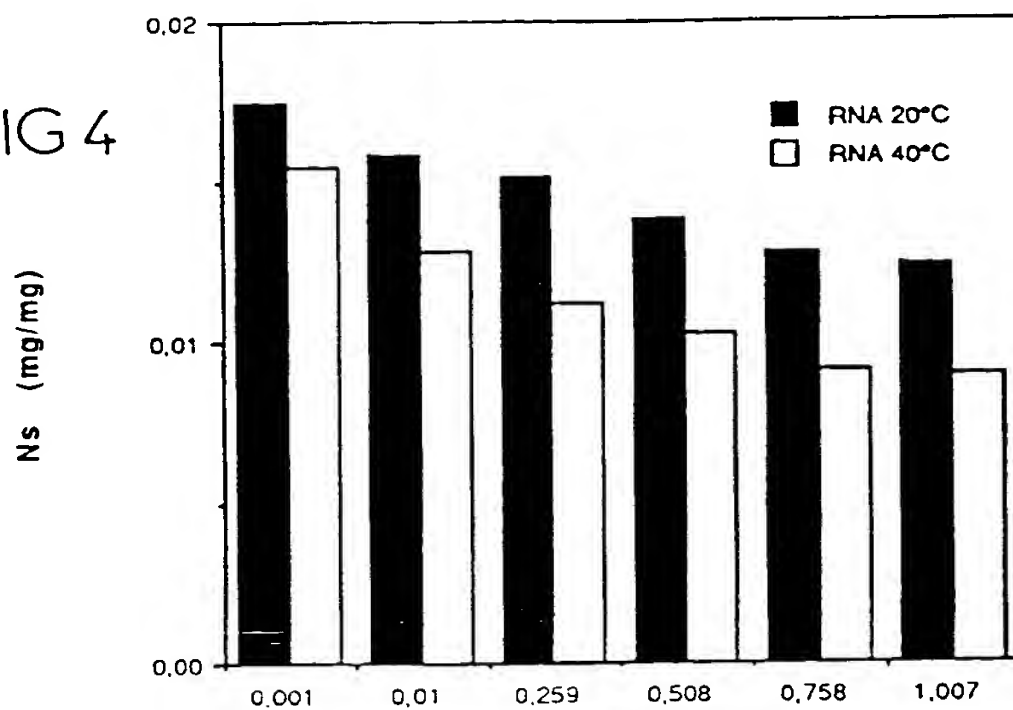
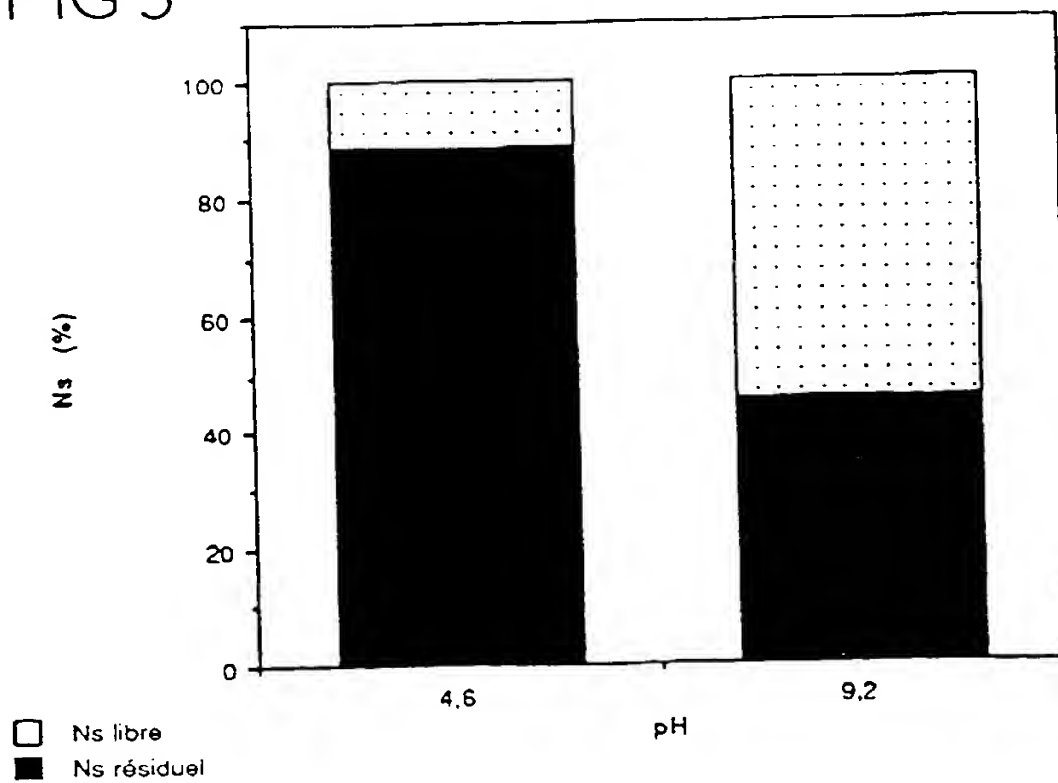


FIG 5



4/4

FIG 6

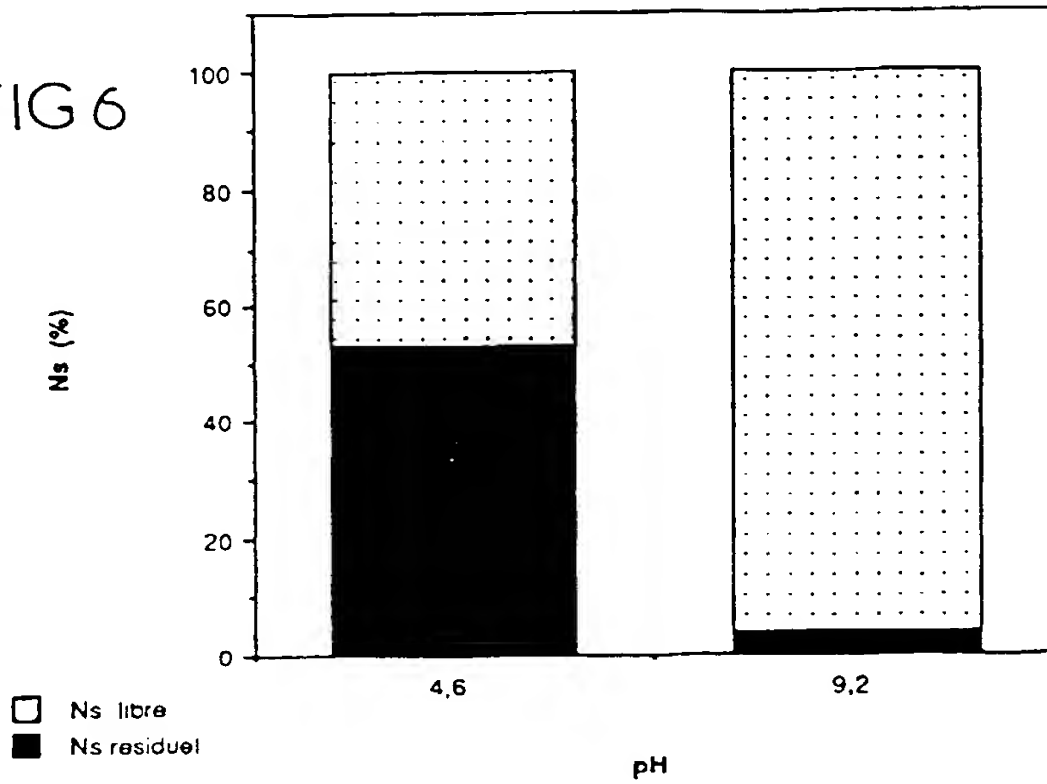


FIG 7

